

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

**Ennetava farmakogeneetilise testimise vajalikkus ning potentsiaal
Eesti tervishoiusüsteemis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Pauliina Ranne

Juhendajad Kristi Krebs M.Sc.

Lili Milani Ph.D

TARTU 2017

Ennetava farmakogeneetilise testimise kasulikkus ja potentsiaal Eesti tervishoiusüsteemis

Bakalaureusetöö annab ülevaate farmakogeneetikaalastest avastustest ning nende rakendamise võimalustest meditsiinis. Lisaks uuritakse töös Eesti Geenivaramu andmete põhjal, milliseid varasemalt tõestatud geneetilise seosega ravimeid Eestis väljakirjutatakse ning kui paljudel biopanga doonoritel on geenivariandid, mis mõjutavad nende ravimite normaalset omastamist. Selle põhjal näitab töö ennetava farmakogeneetilise testimise kasutuselevõtu võimalikku kasulikkust ravimite väljakirjutamisel ka Eesti tervishoiusüsteemis.

Märksõnad: farmakogeneetika, CPIC, ADR, meditsiin.

CERCS: B220

The benefits and potential of using pre-emptive pharmacogenetical testing in Estonian medical system

The Bachelor's thesis gives an overview of discoveries in the field of pharmacogenetics and of the possibilities of implementing this knowledge into medical care. Based on analyses of the data of the Estonian biobank, it gives an overview of pharmacogenetic drugs that have been prescribed to Estonian donors, and the frequency of genetic variants that affect the use of these drugs. Based on this data, the thesis emphasizes the necessity and advantages of using data from pre-emptive pharmacogenetic testing for drug prescription in the Estonian medical care system.

Keywords: pharmacogenetics, CPIC, ADR, medicine.

CERCS: B220

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1 Mis on farmakogenoomika?	6
1.2 Ravimi efektiivsus ja kõrvaltoimed	6
1.3 Tsütokroom P-450	7
1.4 Farmakogeneetilised uuringud	9
1.4.1 Uurimismeetodid	9
1.4.2 Kliiniliselt valideeritud seosed: Varfariin ja simvastatiin	10
1.5 Farmakogenoomika viimine haiglasse	12
1.5.1 PharmGKB	12
1.5.2 CPIC ja DWPG	13
1.5.3 Rakendamine	14
2. UURIMUS	17
2.1 Töö eesmärk	17
2.2 Materjalid ja metoodika	17
2.2.1 Valim	17
2.2.2 Ravimiandmed	18
2.3 Tulemused	18
2.4 Arutelu	24
KOKKUVÕTE	27
SUMMARY	28
TÄNUAVALDUSED	30
KASUTATUD KIRJANDUS	31
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	34
LISAD	35
LIHTLITSENTS	37

KASUTATUD LÜHENDID

ADME	Ravimi imendumine, laiali kandumine, metabolism ja väljutamine (<i>adsorption, distribution, metabolism, excretion</i>)
ADR	Ravimi kõrvaltoime (<i>adverse drug reaction</i>)
CDS	Kliiniline otsustustugi (<i>clinical decision support</i>)
COAG	<i>Clarification of Optimal Anticoagulation through Genetics</i>
CPIC	<i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i>
CYP	Tsütokroom P-450
DPWG	<i>The Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy Pharmacogenetic Working Group</i>
EHR	Elektroonilised terviseandmed (<i>electronic health record</i>)
EU-PACT	<i>European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy</i>
GWAS	Ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud (<i>genome wide association studies</i>)
LDL	Madala tihedusega lipoproteiin (<i>low density lipoprotein</i>)
NGS	Teise põlvkonna sekveneerimine (<i>next generation sequencing</i>)
PREPARE	<i>Preemptive Pharmacogenomic Testing for Prevention of Adverse Drug Reactions</i>
SNP	Ühenukleotiidiline polümorfism (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
TPMT	Tiopuriinmetüültransferaas
TPP	<i>Translational Pharmacogenetic Program</i>
TÜ EGV	Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu
UM	Ülikiire metaboliseerija (<i>ultra-rapid meaboliser</i>)
U-PGx	<i>The Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium</i>
WES	Kogu eksoomi sekveneerimine (<i>whole exome sequencing</i>)
WGS	Kogu genoomi sekveneerimine (<i>whole genome sequencing</i>)

SISSEJUHATUS

Samal ravimil ning annusel võib olla erinevatele inimestele erinev mõju. Suurele osale inimestele toimib ravim tavapäraselt, kuid väiksele osale võib ravim mitte mõjuda või tekitada ka tõsiseid kõrvalmõjusid, mis halvimal juhul lõppevad surmaga. Sellised soovimatud kõrvalmõjud tekitavad patsientidele ebameeldivusi, pikendavad raviks kuluvat aega ning suurendavad tervishoiusüsteemi kulutusi.

Tänu põhjalikele genoomiuuringutele on avastatud mitmeid geenide ning ravimitoime vahelisi seoseid, mis potentsiaalselt võimaldaksid ravimite väljakirjutamise ning doseerimise muuta personaalsemaks ning iga patsiendi genoomist lähtuvaks. See tähendab, et osade ravimite puhul saaks genotüübi andmete abil ennustada patsiendi organismi ravimi omastamisvõimet ning teadmisi rakendades vajadusel muuta annust või kirjutada välja mõni alternatiivne ravim. Nii on suurem tõenäosus, et patsient saab esimese korraga õiges annuses sobivat ravimit.

Bakalaureusetöö eesmärk on uurida Tartu Ülikooli Geenivaramu andmete põhjal, kui paljud geenidoonorid on võtnud ravimeid, mille kohta on CPIC konsortsium välja töötanud ravisuunised ning kui paljudel neist esinevad ka geneetilised variandid, mis mõjutavad konkreetse ravimi toimet. Saadud andmete põhjal hindab töö ennetava farmakogeneetilise testimise vajalikkust ja olulisust ravimite väljakirjutamisel.

1.KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Mis on farmakogenoomika?

Farmakogenoomika eesmärk on määratleda organismis ravimite toimet mõjutavaid geenivariante. Ravimid, mis enamikele inimestele on efektiivsed, võivad osadele patsientidele tekitada ohtlikke kõrvalmõjusid (*adverse drug reaction*, ADR) või üldse mitte mõjuda (Weinshilboum, 2003).

Esimesed tähelepanekud indiviidide vaheliste farmakogeneetiliste erinevuste kohta pärinevad Vana-Kreekast, kuid tõsisemalt sai farmakogeneetika alguse 1950. aastate lõpus, kui kliinilistes katsetes (Kalow ja Staron, 1957; Kalow ja Gunn, 1959; Evans et al., 1960) märgati ravimi kontsentratsiooni erinevusi patsientide vereplasmas ja uriinis ning leiti, et see on seotud pärilikkusega (Ma & Lu, 2011). Algselt uuriti monogeenseid tunnuseid, kuna nende mõju ja edasipärandumine on kergemini märgatavad, kuid tänaseks on teada, et enamikke tunnuseid mõjutab mitmete geneetiliste ja keskkonna tegurite koosmõju (Maggo et al., 2016). Inimese genoomi projekti (*Human Genome Project*, HGP) valmimine ja tehnoloogia areng kiirendasid ravimivastust mõjutavate variatsioonide avastamist, kuna oli võimalik uurida korraga mitmete inimeste genome, kellel oli sama fenotüüp mingi ravimi toime suhtes. Ülegenoomsete uuringute tegemise tõttu võeti kasutusele ka termin farmakogenoomika (Relling ja Evans, 2015). Farmakogenoomika alaste teadmiste reaalne kasutuselevõtt meditsiinis on olnud väga aeglane, kuna seda takistavad näiteks mõnel juhul alternatiivse ravi puudumine, puudulikud juhised geenandmete tõlgendamiseks ravis, kehvad andmebaasid nii suurte andmete haldamiseks jmt (Relling and Evans, 2015).

1.2 Ravimi efektiivsus ja kõrvaltoimed

Ravimi toimet mõjutavad geneetilised faktorid põhjustavad suurt varieeruvust indiviidide ning etniliste populatsioonide vahel. Samuti on suur roll füsioloogilistel faktoritel (nt sugu, vanus, rasedus), keskkonna faktoritel (nt kemikaalid ja kahjulikud kiirgused) ning elustiilil (nt tubaka, alkoholi tarvitamisel ja füüsilisel aktiivsusel). Geneetiline mõju avaldub polümorfismide tõttu geenides, mis reguleerivad ravimi farmakokineetikat ja -dünaamikat. Kuigi ravimivastust võib mõjutada juba ainult üks ühenukleotiidiline polümorfism (*single nucleotide polymorphism*, SNP) või haplotüüp, siis enamasti on tegu mitmete geenivariantide koosmõjuga (Ma ja Lu,

2011). Farmakokineetika on seotud ravimite imendumise, organismis edasikandumise, metabolismi ning väljutamisega (ADME – *adsorption, distribution, metabolism, excretion*) ning farmakodünaamika ravimi sihtmärgi või bioloogiliste radade muutustega (Relling ja Evans, 2016). Teadmisi ravimite farmakodünaamikast on praegu vähem, kuna selle uurimine on keerulisem, sest paljude ravimite sihtmärgid ei ole selgelt teada ning tihti võib neil olla ka mitu sihtmärki. Samuti on keeruline *in vivo* mõõta ravimi mõju sihtmärgile (Pirmohamed, 2013).

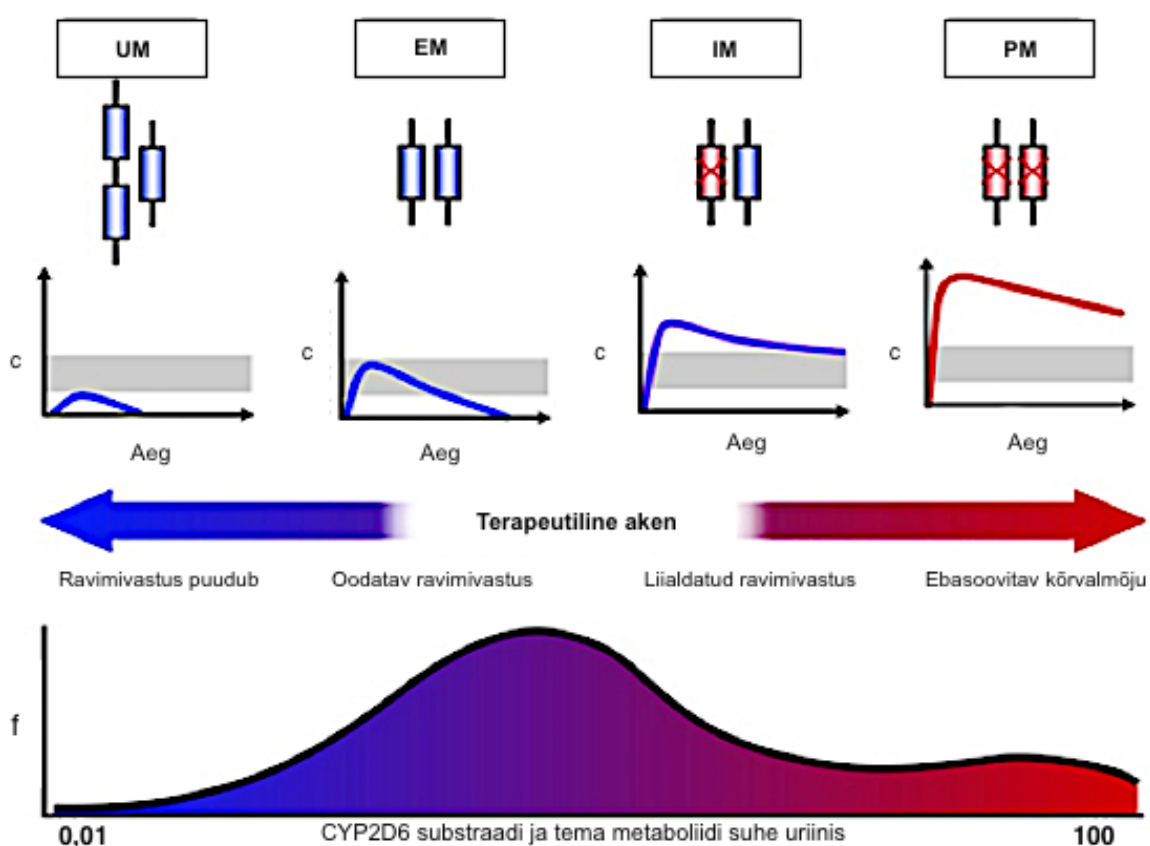
Ravimite efektiivsus võib varieeruda indiviidide vahel suurel määral ja on hinnatud, et sõltuvalt ravimist võib efektiivne mõju esineda 10%–90% patsientidest (Spear et al, 2017). Tihti võivad tekkida ka ravimi kõrvaltoimed (*adverse drug reaction, ADR*), mis on Lazarou et al. uuringu kohaselt hospitaliseeritud patsientide seas 4.–6. surma põhjustest. ADR-dest põhjustatud kulud tervishoiusüsteemile on väga suured, USAs umbes 4 miljardit dollarit aastas (Lazarou et al, 1998). Euroopas hinnati, et ADR-d on 2,5%–10,6% haiglasse sissekirjutamiste põhjuseks (Sultana et al., 2013). Eestis raporteeriti ravimiametile 2016. aastal 215 ravimi kõrvaltoime juhtumit, millest 75,8% liigitati tõsisteks kõrvaltoimeteks. Tõsise ravimi kõrvaltoime alla liigitatakse reaktsioon, mis võib põhjustada surma, patsiendi eluohtlikku seisundit, püsivaid tervisehäireid, töövõimetust, ravimsõltuvust või mõjutab haiguse kestust ning kulgu. (www.ravimiamet.ee, seisuga 21.mai 2017) Uuringud on näidanud, et parandades ravimite väljakirjutamise harjumusi, võiks vältida 70% ADR-dest (Howard et al., 2007).

Vahemiku, kus ravimiannus peaks olema efektiivsem ning ei oma kahjulikke kõrvalmõjusi, määrab terapeutiline aken. Mida suurem on annus, seda efektiivsemalt ravim mõjub, kuid seda suurem on ka ravimi toksilisus. Varieeruvus ravimitoimet mõjutavates geenides muudab indiviidide jaoks ka terapeutilist akent. Eriti mõjutavad variatsioonid kitsa terapeutilise aknaga ravimite toimet (Joonis 1). Näiteks on selline ravim varfariin, mis on üks enim kasutatavaid verevedeldajaid ning, mille efektiivne annus võib patsientide vahel erineda 30-kordselt (Rettie and Tai, 2006).

1.3 Tsütokroom P-450

Selleks, et ravimid toimiksid, on need vaja viia organismis paremini omastatavale kujule. Tsütokroom P-450 (CYP) on valkude superperekond, kuhu kuulub suur osa ravimite metabolismi eest vastutavaid ensüüme, mis tõstavad ravimite vees lahustuvust või muudavad

need aktiivsemateks ühenditeks (Ahmed et al., 2016). Vastavalt koos esinevatele CYP alleelidele jaotuvad patsiendid aeglasteks (*poor metabolisers* PM), vahepealseteks (*intermediate metabolisers*, IM), kiireteks (*extensive metabolisers*, EM) ja ülikiireteks (*ultra-rapid metabolisers*, UM) metaboliseerijateks. PM puhul on geeni kaks alleeli mittefunktsionaalsed, mille tõttu ravimi metabolism on väga aeglane, IM-l on üks mittefunktsionaalne alleel, mille tõttu metabolism on normaalsest natuke aeglasem. EM-l toimub normaalne metabolism ning UM puhul esineb lisaalleel, mis kiirendab ravimi metabolismi (Joonis 1) (Ahmed et al., 2016).



Joonis 1. Variatsioonidest põhjustatud ravimi metabolismitüübid ning nende mõju ravimivastusele *CYP2D6* näitel. (<http://www.gbhealthwatch.com/Trait-Beta-Blocker-Response.php>, 21.mai 2017)

Enim uuritud ensüüm CYP perekonnas on CYP2D6, mis vastutab umbes 25% ravimite metabolismi eest ning mida kodeeriv geen on väga polümorfne (Zhou, 2009). Variante, mis ensüümi aktiivsust inaktiveerivad või vastupidiselt liigset aktiivsust põhjustavad, on teada üle 75 (Pirmohamed, 2013). Enim mõjutavad ravimitoimet *CYP2D6*2XN*, mis põhjustab UM

metaboliseerimistüüpi ning *CYP2D6**3–*6, mis põhjustavad madalamat ensüümi aktiivsust (Ahmed et al., 2016). *CYP2D6**2*XN* on eriti ohtlik kodeiini manustavatele imetavatele emadele. Nende organism lagundab väheaktiivset kodeiini aktiivsemaks ühendiks ehk morfiiniks ohtlikes kogustes, mis kandub emapiimaga edasi ka lapsele ning võib põhjustada lapse surma (Gasche et al., 2004). Kaukaasia populatsioonis esineb UM metabolismitüüp umbes 3%–5%, EM 70%–80%, IM 10%–17% ja PM 5%–10% (Sachse et al., 1997). Metabolismitüüpide esinemissagedus on aga etniliste populatsioonide vahel erinev. Näiteks Saudi Araabias ja Etioopias esineb tunduvalt rohkem *CYP2D6* UM metabolismitüüpi (Ahmed et al., 2016).

Samuti on väga oluline ensüüm *CYP2C9*, mis osaleb umbes 25% ravimite metabolismis. On teada rohkem kui 60 erinevat *CYP2C9* varianti, kuid enim levinud neist on ensüümi aktiivsust aeglustavad *CYP2C9**2¹ ja *CYP2C9**3 (Wei et al., 2007). Euroopas on alleelisagedused nendel variantidel vastavalt 9,5% ja 5,7% (PharmGKB andmebaas, seisuga 28.mai 2017). Iraani ja Pakistani populatsioonides on nende variantide esinemist täheldatud rohkem kui teistes populatsioonides (Azarpira et al., 2010). Samas Korea, Vietnami ja Hiina populatsioonides ei ole *CYP2C9**2 varianti leitud (Ahmed et al., 2016).

1.4 Farmakogeneetilised uuringud

1.4.1 Uurimismeetodid

Farmakogeneetika algusaastatest on uurimismeetodid nihkunud ensüümi aktiivsuse fenotüpiseerimiselt pigem kogu genoomi uuringuteni nagu ülegenoomse assotsiatsiooniuuring (genome-wide association study, GWAS) ning teise põlvkonna sekveneerimine (*next generation sequencing*, NGS). Ravimi ja selle metaboliidi suhte mõõtmist ensüümi aktiivsuse väljaselgitamiseks kasutatakse siiski ka tänapäeval näiteks tiopuriinmetüültransferaasi (TPMT) aktiivsuse mõõtmiseks erütrotsüütides, kuna seda

¹ CYP-de puhul ning ka mõnede teiste ravimtoimega seotud geenide ning haplotüüpide kirjeldamiseks kasutatakse *star-allele* nomenklatuuri. *1 tähistab enamasti normaalse funktsiooniga geeni või haplotüüpi, *2, *3 jne muutunud funktsiooniga geeni või haplotüüpi. (Kalman, et al., 2017)

peetakse genotüpiseerimisest usaldusväärsemaks, sest annab kvantitatiivse TPMT-i aktiivsuse (Pirmohamed, 2013).

NGS meetodid võimaldavad efektiivselt sekveneerida DNA-d ning tehnoloogia arenguga on muutunud analüüs ka tunduvalt odavamaks. Kuna kogu genoomi sekveneerimine (*whole genome sequencing*, WGS) on kallim ja analüüsimine keerulisem, eelistatakse tihti uuringutes ainult eksoomi (1% genoomist) sekveneerimist (*whole-exome sequencing*, WES), mille abil saab identifitseerida samuti kõiki mutatsioone valke kodeerivates alades. Selle meetodi miinuseks aga on, et mutatsioonid intronites, mis võivad samuti osaleda mingi ADR põhjustamises, jäävad teadmata (Maggo et al., 2016).

Lisaks kasutatakse DNA variatsioonide kaardistamiseks genotüpiseerimist. Farmakogeneetiliste markerite tuvastamiseks on loodud eraldi kiipe, nt Affymetrix DMET, et genotüpiseerida ravimitega seotud geene. Kiipidega genotüpiseerimine on kõige kiirem ja odavam genotüpiseerimismeetod, teades milliseid geneetilisi variatsioone soovitakse määrata. Meetodi miinuseks võrreldes WGS-iga ja WES-iga on, et saadakse genotüpiseerida ainult juba tuntud variante. WGS ja WES abil saab tuvastada ka uusi ravimitoimet mõjutavaid variante ning ka neid, mis on harva esinevad (Yang et al., 2016).

Farmakogeneetilises GWAS uuringus analüüsitakse miljoneid SNP-e üle kogu genoomi eesmärgiga tuvastada ravimtoimega seotud geene. Suurim probleem ADR-e põhjustavate geneetiliste seoste avastamisel GWAS meetodil on piisava suurusega uuritava fenotüübiga valimi leidmine, kuna ADR-id on pigem harvad (Maggo et al., 2016).

1.4.2 Kliiniliselt valideeritud seosed: Varfariin ja simvastatiin

Varfariin on üks peamisi kasutatavaid antikoagulantere. Ta inhibeerib vitamiin K epoksiidi reduktaasi kompleksi subühik 1 (VKORC1), mille tõttu saab rohkem vitamiini K kasutada koagulatsioonifaktorite sünteesimiseks (Lee et al., 2014). Varfariini terapeutiline aken on kitsas, mille tõttu tekivad tihti ohtlikud ning võimalik, et isegi surmaga lõppevad kõrvalnähud. Sõltuvalt esinevatest alleelidest võib varfariin osadel patsientidel põhjustada liigseid verejookse ning teistel jällegi mitte mõjuda ning selle tõttu mitte takistada trombide teket (Lindh et al., 2008).

Praeguseks on analüüside abil kindlaks tehtud ja palju uuritud kahte geeni *CYP2C9* ja *VKORC1*, milles esinevatel polümorfismidel on tugev mõju varfariini toimele. Täpsemalt mõjutavad ravimi toimet *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3* alleelid, mis põhjustavad aeglasemat ensüümi aktiivsust (Flockhart et al., 2008). Nendele andmetele tuginedes võiks genotüpiseerida varfariini saavate patsientide *CYP2C9* ja *VKORC1* geenid, et annuse määramine oleks potentsiaalselt kiirem ja ohutum. Sellegi poolest mõjutavad teadaolevad faktorid (*CYP2C9*, *VKORC1*, füsioloogilised näitajad) varfariini toime varieeruvust vaid 50% võrra, kuid ülejäänud 50% on endiselt teadmata. Selle tõttu eelistavad paljud arstid varfariini annuse määramiseks klassikalist verehüübimistesti genotüpiseerimisele (Ma & Lu, 2011).

Uuringud *CYP2C9* genotüpiseerimise kasulikkusest varfariini doseerimisel on saanud erinevaid tulemusi. Näiteks EU-PACT (*European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy*) uuringust tuli välja, et genotüpiseerimisel põhinev varfariini doseerimine suurendas patsientide arvu, kes jäid terapeutilisse vahemikku ning vähendas liigsest ravimi toimest tingitud verejooksude juhtumeid (Pirmohamed et al., 2013). Seevastu COAG (*Clarification of Optimal Anticoagulation through Genetics*) uuring ei leidnud genotüpiseerimisest tulenevat kasu (Kimmel et al., 2013). Kuid Kimmel et al. uuringus oli palju suurem protsent Aafrika populatsiooni esindajaid, kellel ei esinegi varfariiniga seotud geenialleele nii suure sagedusega kui Euroopa populatsioonis. Samuti oli selles uuringus osalejate vanus väiksem ning vähem oli patsiente südame rütmihäiretega, kellel on suurem tõenäosus varfariini manustamisel jääda välja terapeutilise akna vahemikust (Roche, 2014).

Statiine sealhulgas simvastatiini kasutatakse madala tihedusega lipoproteiinide ehk nn “halva” kolesterooli (*low-density lipoprotein*, LDL) taseme alandamiseks, mis omakorda vähendab südamehaiguste ohtu. Mõnedel patsientidel võib statiinide kasutamise kõrvalmõjuna tekkida müopaatia, mis võib põhjustada ka surma. Enamasti esineb statiinidest põhjustatud müopaatiat harva, kuid tõenäosus selle tekkeks kasvab ravimiannuse suurendamisega (Davidson et al., 1997).

Simvastatiin muudetakse vereplasmas, maksas ja soole limaskestas aktiivseks metaboliidiks, simvastatiin happeks. *SLCO1B1* kodeerib transporterit OATP1B1, mis transpordib statiine maksarakkudesse (Pasanen et al., 2006). 156 patsiendiga kohordi uuringus manustati kõigile LDL kolesterooli alandamiseks soovituslik maksimum annus ehk 40 mg/päevas simvastatiini, kuid 5%-l patsientidest LDL kolesterooli langust ei toimunud ning seda ka siis kui ravimiannust suurendati 160 mg/päevas (Davidson et al., 1997). On näidatud, et mutatsioonid *SLCO1B1*

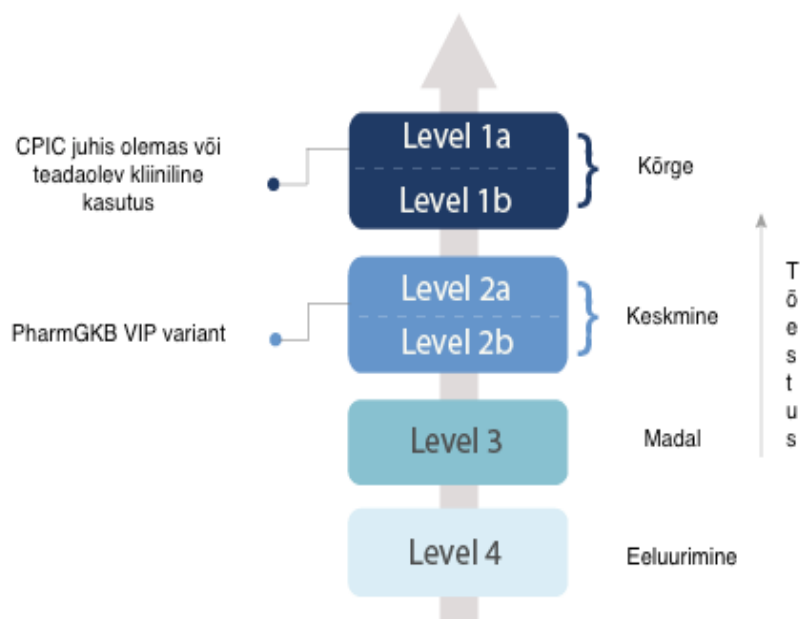
geenis mõjutavad statiinide farmakokineetikat. Patsientidel, kellel on CC genotüüp, ei vii transporter piisavalt simvastatiin hapet rakkudesse, mille tõttu LDL kolesterooli ei lagundata piisavalt efektiivselt. LDL koguneb veresoonte seintele, takistades verevoolu ning põhjustades infarktiohtu. Lisaks võib esineda kõrvaltoimena lihaskahjustusi sh lihasvalu ja müopaatiat. On ka teisi geneetilisi mutatsioone, mis mõjutavad statiinide toimet, kuid *SLCO1B1* genotüüpiseerimine on üks, mis võiks aidata statiinravi efektiivsemaks muuta (The SEARCH Collaborative Group, 2008).

1.5 Farmakogenoomika viimine haiglasse

1.5.1 PharmGKB

The Pharmacogenomics Knowledgebase (PharmGKB, www.pharmgkb.org) on farmakogeneetilise informatsiooni andmebaas, mis loodi 1999.aastal. Üldine missioon PharmGKB-l on koguda, hallata ja levitada informatsiooni, kuidas geneetilised variatsioonid mõjutavad ravimivastust. Nende andmebaasi on kogutud kahe rahvusvahelise töögrupi, *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* ja *The Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy – Pharmacogenetic Working Group*, kirjutatud kliiniliselt kasutatavad ravimisuunised, üldine ravimite info, potentsiaalselt kliiniliselt rakendatavad geen-ravim seosed, genotüüp-fenotüüp seosed (Thorn et al., 2013).

Farmakogeneetilistest publikatsioonidest otsitakse välja kirjeldatud geen-ravim seosed ja kirjutatakse standardiseeritud kirjeldused geen-ravim seoste kohta ning seejärel luuakse ravimi metabolismirada kirjeldavad joonised. Eraldi on veebilehel välja toodud ka väga tähtsate farmakogeenide (*very important pharmacogene*, VIP) põhjalikud ülevaated. Lisaks kirjutatakse ravimist ja temaga seostatud geenivariantidest ülevaated, mis sisaldavad ka kliinilisi tõlgendusi. Sõltuvalt tõendusmaterjali tugevusest antakse igale geen-ravim paarile hinnang skaalal ühest neljani – 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4 (Joonis 2). Viimaks on olemas ka kliiniliselt kasutatav informatsioon – doseerimissuunised ning ravimiinfo, kus on eraldi välja toodud ka farmakogeneetiline info (Thorn et al., 2013).



Joonis 2. PharmGKB kasutatav geen-ravim paaride liigitus vastavalt nende kohta olemasolevale tõestusmaterjalile. (<https://www.pharmgkb.org/page/clinAnnLevels>, seisuga 21.mai 2017)

1.5.2 CPIC ja DWPWG

CPIC (*Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) on rahvusvaheline teadlaste ja arstide grupp, mis loodi 2009. aastal. Grupp tegeleb suuniste loomisega, mis kirjeldavad farmakogeneetiliste andmete tõlgendamist raviotsuste tegemisel. Konsortsiumi eesmärk ei ole anda soovitusi, millal teha farmakogeneetiline test, vaid nende visioon on, et arstidel peaks olema patsiendi geneetilised andmed kättesaadavad kogu aeg, et efektiivsemalt ja nii kiiresti kui võimalik ravimit välja kirjutada. (<https://cpicpgx.org/>, seisuga 23.mai 2017)

CPIC määrab, milliste geen-ravim paaride kohta on piisavalt tõestusmaterjali, et nende kasutamine meditsiinis oleks kasulik. Ravimi väljakirjutamisel geenandmete arvestamise vajalikkuse põhjal antakse geen-ravim paarile väärtus A–D. A puhul on tõestusmaterjal geen-ravim paaride kohta kõige tugevam ning antakse selgeid soovitusi ravimi väljakirjutamise muutmiseks. (<https://cpicpgx.org/prioritization/#flowchart>, seisuga 21.mai 2017). Hetkel on CPIC lehel suunised 44 geen/ravim paari kohta, mis puudutavad 14 geeni ja 36 ravimit. (<https://cpicpgx.org/genes-drugs/>, seisuga 21.mai 2017)

Euroopas on CPIC-le sarnane töögrupp *The Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy – Pharmacogenetics Working Group* (DPWG), mis loodi 2005.aastal ning tegeleb

samuti doseerimissuuniste loomisega. Mõlema grupi suunised avaldatakse ka PharmGKB kodulehel. (Dunnenberger et al., 2015)

1.5.3 Rakendamine

Siiani on farmakogeneetiliste testide tegemine tervishoiu asutustes piirdunud geenipõhise testimisega, mis tähendab, et geenitest tehakse alles siis, kui ollakse kindlad, et patsiendile tahetakse kirjutada kõrge riskiga ravimit. Positiivne külg selle juures on, et ravimi kirjutamisel lähtutakse geenianndmetest, kuid üldiselt on eraldi geeni testimine kulukas ning mõningatel juhtudel liiga aeglane. Lisaks peavad arstidel olema head teadmised, kuidas tõlgendada geen-ravim vahelist seost. Need negatiivsed küljed on põhjuseks, miks farmakogeneetilised testid ei ole laialt kasutusel ning tihtipeale kirjutatakse patsientidele ravimeid, mis võivad olla neile tegelikult ohtlikud. (Dunnenberger et al., 2015)

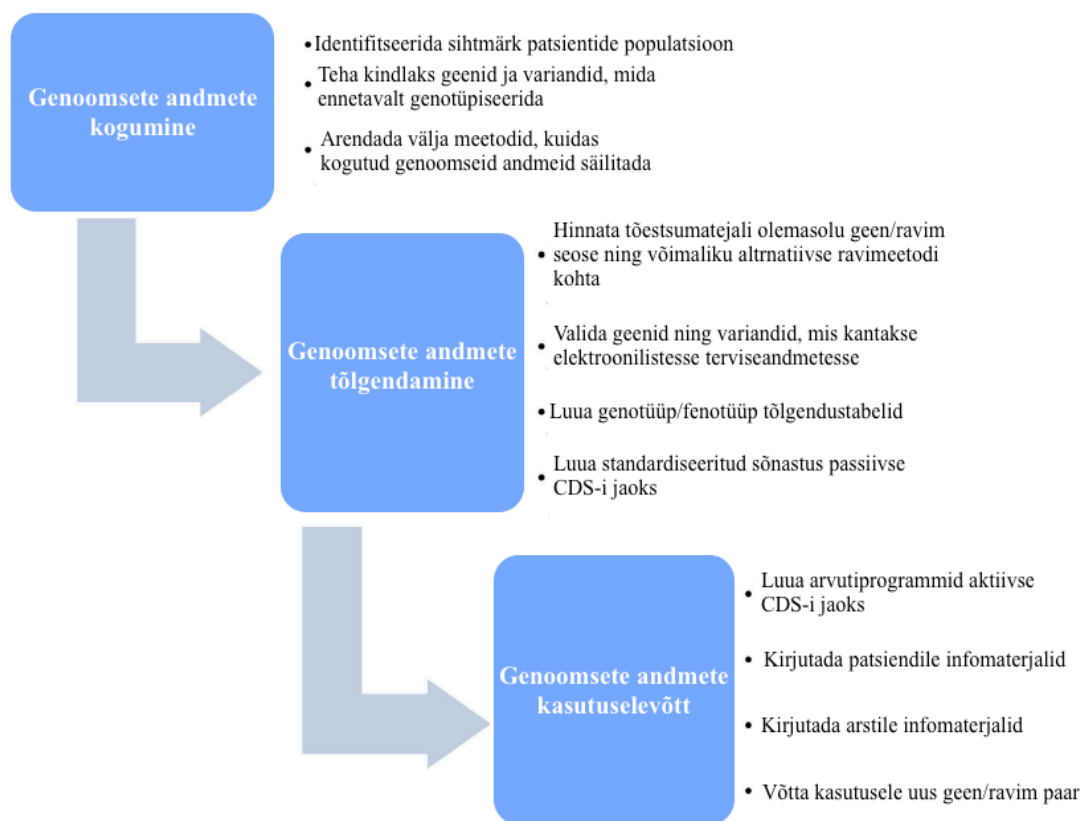
Kuna genotüpiseerimine muutub aina odavamaks, siis üks võimalus muuta farmakogeneetilist testimist mugavamaks on ennetav testimine. See tähendab, et patsientide geenianndmed ravimvastust mõjutavate geenide kohta on teada juba enne ravimi väljakirjutamise vajadust. Need andmed saadakse genotüpiseerides kiipide abil ravimtoimet mõjutavad geenid ning säilitatakse patsientide ravikaardis. Selline lähenemine on tunduvalt odavam, kuna kiipidel põhinev testimine võimaldab ühe testiga genotüpiseerida enamik hetkeseisuga teadaolevaid farmakogeene ning selle sama testi andmeid saab kasutada kogu elu jooksul (Schildcrout et al., 2012).

Geene, mida võib juba praegu kindlalt seostada mingi ravimi toimega, on umbes 12 ning USA uuringute andmetel esineb >98,5% heleda- ja tumedanahalistel vähemalt üks kõrge riskiga diplotüüp (Dunnenberger et al., 2015). Samuti on teada, et USAs kõikidest välja kirjutatavatest ravimitest 18% on mõjutatud geneetilisest varieeruvusest ehk on kõrge riskiga ravimid (Relling ja Evans, 2015). Mõned raviasutused USAs on hakanud tegelema ennetava farmakogeneetilise testimise kliinikus rakendamisega, et seeläbi vähendada ka ADR-de hulka. Nende haiglate hulka kuuluvad näiteks *St. Jude Children's Research Hospital* ja *Vanderbilt University Medical Centre*, kus näidati, et aasta jooksul said vähemalt ühte farmakogeneetiliselt kõrge riskiga ravimit peaaegu pooled patsientidest, vastavalt 48% ja 54%. Samuti, võttes arvesse kuut kõrge riskiga ravimit näidati *Vanderbilt University Medical Centre*'is, et 52 942 patsiendi andmete

põhjal oleks ennetava genotüpiseerimise abil saadud viie aasta jooksul ära hoida 398 ADR-i. (Schildcrout et al., 2012)

2011.aastal loodi USAs *Translational Pharmacogenetic Program* (TPP). Programmis osalevad 8 asutust (Mayo Clinic, Ohio State University, St. Jude Children's Research Hospital, University of Florida, University of Maryland, Vanderbilt University Medical Center, University of Chicago, Brigham and Women's Hospital), kes töötavad välja meetodeid, kuidas saaks kõige efektiivsemalt farmakogeneetilisi andmeid meditsiinis kasutusele võtta (Shuldiner et al., 2013).

Asutused on eesmärgiks võtnud ennetava farmakogeneetilise testimise rakendamise ning selle saavutamiseks ette võetud sammud sarnanevad erinevatel asutustel mitmes aspektis. Kõigepealt luuakse patsientide valimiseks süsteem nii, et farmakogeneetilised andmed kogutakse neilt patsientidelt, kellele on suurem tõenäosus tulevikus välja kirjutada mõnda kõrge riskiga ravimit. Geen/ravim seose kasutusvõimalusi hindab ning vaatab üle spetsiaalne komitee ja otsustab, milliste geenide andmed sisestatakse elektroonilistesse terviseandmetesse (*electronic health record*, EHR) ning, milliste kohta luuakse kliiniline otsustustugi (*clinical decision support*, CDS). CDS annab arstile ravimi väljakirjutamisel signaali ning teavitab teda, et tegemist on kõrge riskiga ravimiga ning patsiendi genotüüp ei ole teada. Selleks ajaks kui rohkem patsiente on juba ennetavalt genotüpiseeritud, on välja töötatud CDS, mis teavitab arsti siis, kui soovitatakse kirjutada patsiendile ravimit, mille suhtes on tal ebasobiv genotüüp. Sel juhul pakub hoiatus ka alternatiivset ravivõimalust. Elektroonilistesse süsteemidesse on sisestatud ka doseerimissuunised, mille CPIC on kirjutanud. Geenandmete kogumiseks kasutavad kõik genotüpiseerimiskiipe. Kõige enam on TPP-s osalevad kliinikud enda EHR-sse kandud *CYP2C19* – klopidoogreel, *SLCO1B1* – simvastatiin, *CYP2D6* – kodeiin, *CYP2C9* ja *VKORC1* – varfariin, *TPMT* –tiopuriinid seosed. (Dunnenberger et al., 2015) Vanderbilt University Medical Centeri andmetel säästsid nad kiibitestide tegemisega 5000 üksiku geeni testimise kirjeldades sellega suurt kulu kokkuhoidmist (Van Driest et al., 2014).



Joonis 3. Vajalikud sammud ennetava farmakogeneetilise testimise rakendamiseks haiglas. (Dunnenberger et al., 2015)

Euroopas loodi *The Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium* (U-PGx), mis alates 2017.aasta jaanuarist viib läbi uuringut *Preemptive Pharmacogenomic Testing for Prevention of Adverse Drug Reactions* (PREPARE). Uuringu käigus viiakse seitsme Euroopa riigi (Austria, Hispaania, Hollandi, Itaalia, Kreeka, UK, Sloveenia) haiglates läbi ennetav genotüpiseerimine kliiniliselt oluliste farmakogeneetiliste markerite suhtes. Tahetakse näidata mitte ühe geen/ravim paari vaid terve paneeli farmakogeenide kliinilist kasutatavust ning sellest saadavat majanduslikku tulu. Lisaks hinnatakse ennetavast testimisest tulenevat mõju esinevate ADR-ide arvule. See on esimene uuring, mis loob ennetava farmakogeneetilise testimise süsteemi mitmetes riikides ning seetõttu ka erinevates tervishoiusüsteemides ning keskendub korraga suurele hulgale farmakogeenidele. Erinevalt USAs läbiviidud programmidest kasutatakse siin DWPG loodud doseerimisjuhiseid (43 ravimi kohta), mis tõlgiti hollandi keelest iga uuringus osaleva riigi keelde. (Wouden et al., 2017)

2. UURIMUS

2.1 Töö eesmärk

Bakalaureusetöö eesmärk on Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu (TÜ EGV) andmete põhjal näidata, kui palju kirjutatakse Eestis välja ravimeid, mille kohta on kirjutatud CPIC suunised ning, kui paljudel inimestel on geenivariandid, mis mõjutavad enim välja kirjutatavaid ravimeid. Lisaks hinnata ennetava farmakogeneetilise testimise rakendamise kasulikkust ja potentsiaali Eesti tervishoiusüsteemis.

2.2 Materjalid ja meetodika

2.2.1 Valim

Bakalaureusetöös kasutati uurimuse teostamiseks TÜ EGV geenidoonorite genotüübi- ja fenotüübiandmeid. Genotüübiandmed koosnesid täisgenoomi ja genotüpiseerimiskiipide valimist. Täisgenoomide valim on saadud 2244 geenidoonori kogu genoomi sekveneerimisest, mis viidi läbi Broadi instituudis, USAs Illumina HiSeq X Ten platvormil. Broadi instituudist saadeti TÜ EGV teadlastele geenidoonorite täisgenoomide andmed, kes teostasid seejärel edasise kvaliteedianalüüsi. Antud töös analüüsiti kvaliteedikontrolli läbinud täisgenoomiandmeid. Genotüpiseerimisvalimi moodustasid uurimuses kolme ülegenoomse kiibiga genotüpiseeritud geenidoonorite andmed: Infinium CoreExome-24 BeadChip Kit (n=6396), Illumina HumanCNV370-Duo BeadChip (n=2658) ja Illumina HumanOmniExpress Beadchip (n= 8138). Lisaks oli TÜ EGV teadlaste poolt määratud kiipidega genotüübiandmed ka imputeeritud ehk ennustatud määratud SNP-de aheldustasakaalutuse (linkage disequilibrium, LD) põhjal uusi polümorfisme. Nendest imputeeritud andmetest võeti välja kasutades *GTOOL* tarkvara varfariini ja simvastatiini toimet mõjutavad geenivariandid, mida kasutati edasiseks analüüsiks. Põhiline andmete analüüs teostati R-tarkvara kasutades.

2.2.2 Ravimiandmed

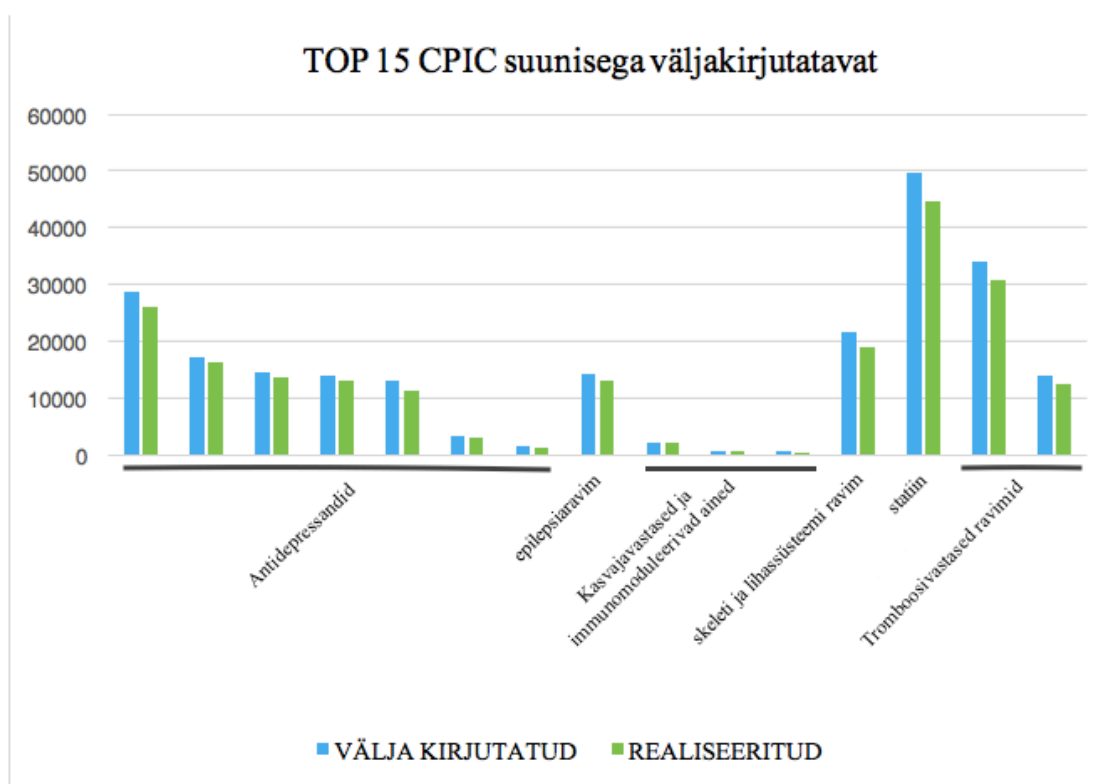
Kokku on andmed kogutud üle 52 000 indiviidi kohta. Kasutuses on neist 51 911 indiviidi fenotüübi andmed, kellest 34 065 on naised ja 17 846 mehed. 51 607 TÜ EGV doonoril on teada haigekassa andmed, mille alla kuuluvad diagnoosid, teenused, väljakirjutatud ravimid.

Ravimiretseptid sisaldavad infot ravimi väljakirjutamise ning realiseerimise kuupäeva, diagnoosi, toimeaine ning ravimi kohta. Kokku on ajavahemikul 13.jaanuar 2003–14.jaanuar 2014 kirjutatud 4 226 358 retsepti.

2.3 Tulemused

CPIC kodulehel on (seisuga 4. mai 2017) avaldatud 44 doseerimissuunist 36 ravimi kohta, mis on seotud 14 geeniga. Eestis on ravimiameti statistika andmetel 2016.aastal välja kirjutatud 27 CPIC suunisega ravimit. Kõige rohkem on nende seas antidepressantide hulka kuuluvaid ravimeid. (<http://ravimiamet.ee/ravimistatistika>, seisuga 21.mai 2017)

17910 TÜ EGV doonorile on välja kirjutatud 25 erinevat CPIC suunisega ravimit. Ravimi retseptid on väljastatud 2.jaanuar 2004 – 15.juuli 2014. Kõige rohkem oli ravimitest välja kirjutatud simvastatiini ja varfariini, vastavalt 49814 retsepti 3749 inimesele ja 34176 retsepti 2337 inimesele. Realiseeritud oli 44740 simvastatiini ja 30708 varfariini retsepti. Joonisel 4 vastab simvastatiinile 13. tulp ja varfariinile 14. tulp.



Joonis 4. 15 enim TÜ EGV doonoritele väljakirjutatavat ravimit, millel on olemas CPIC doseerimissuunis ning nende ravimite retseptide realiseerimine.

Varasemalt on näidatud, et varfriini ravimivastust organismis mõjutavad kolm varianti (rs1799853, rs1057910, rs9923231) geenis *CYP2C9* ja simvastatiini ravimivastust rs4149056 *SLCO1B1* geenis. PharmGKB on andnud neile variantidele 1a hinnangu, mis tähendab, et CPIC on kirjutanud nende variant–ravim kombinatsioonide kohta ravisuunise või lisaks on neid mõnes suures meditsiinilises asutuses juba ka rakendatud. Neist variantidest on Euroopa populatsioonis kõige sagedasem *VKORC1* (rs9923231) variant, mille alleelisagedus on 39,8%. (Tabel 1)

Tabel 1. Varfariini ja simvastatiini toimet mõjutavad geenivariandid ning nende alleelisagedus Euroopas. Andmed võetud PharmGKB andmebaasist.

Geen	Variant	Variandi tüüp	Fenotüüp	Variandiinfo	Alleelisagedus Euroopas
<i>CYP2C9</i> *2	rs1799853	<i>Missense</i>	Aeglane metaboliseerija	C>T	T=9,5%
<i>CYP2C9</i> *3	rs1057910	<i>Missense</i>	Aeglane metaboliseerija	A>C	C=5,7%
<i>VKORC1</i>	rs9923231	5' <i>Flanking</i>	Aeglane metaboliseerija	C>T	T=39,8%
<i>SLCO1B1</i>	rs4149056	<i>Missense</i>	Aeglane metaboliseerija	T>C	C=15%

Missense – SNP, mis põhjustab aminohappe muutuse

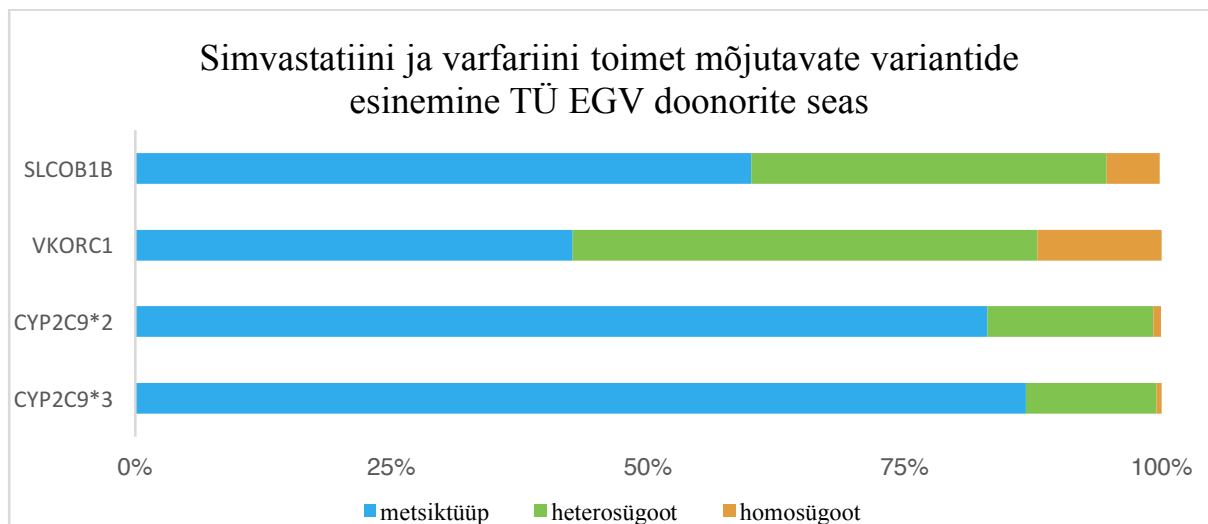
5' *Flanking* – SNP geeni 5' otsa lähedal, mis võib muuta transkriptsiooni regulatsiooni

12463 TÜ EGV doonoril on määratud varfariini ja simvastatiini ravimivastust mõjutavad geenivariandid. Valimist järeldus, et variatsioon *VKORC1* geenis esineb 57,4% geenidoonoritest ja neist 12,1 % esineb variant homosügootse vormina (Tabel 2). Samuti on TÜ EGV geenidoonorite hulgas sage geeni *SLCO1B1* SNP-i rs4149056 esinemine (40%). 5,2%-il esineb SNP homosügootse vormina, mis tähendab kahe aeglase funktsiooniga alleeli esinemist ja seetõttu suuremat riski simvastatiini kõrvaltoime tekkeks. (Tabel 2)

2244 geenidoonori WGS andmete põhjal on alleelisagedused sarnased Euroopa alleelisagedustega, vastavalt rs1799853 (T=8,4%), rs1057910 (C=7,3%), rs9923231 (T=34,6%), rs4149056 (C= 21,5%).

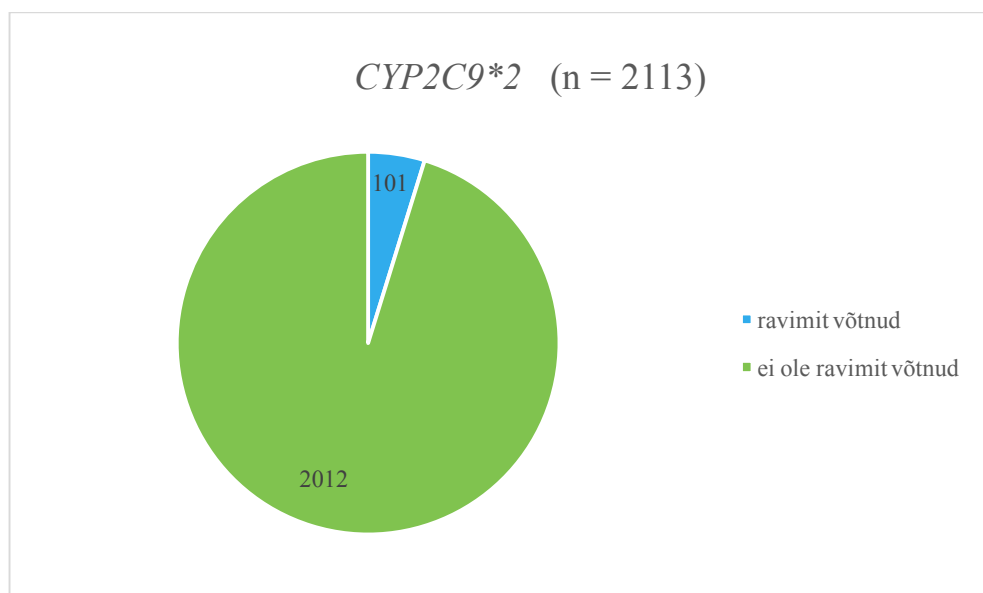
Tabel 2. Simvastatiin ja varfariini mõjutavate variantide esinemissagedus TÜ EGV doonorite hulgas (n= 12463).

Geen	Variant	Heterosügootid	Homosügootid	Metsiktüüp
<i>CYP2C9*2</i>	rs1799853	2022 (16,2%)	91 (0,7%)	10350 (83,0%)
<i>CYP2C9*3</i>	rs1057910	1582 (12,7%)	64 (0,5%)	10817 (86,8%)
<i>VKORC1</i>	rs9923231	5649 (45,3%)	1504 (12,1%)	5310 (42,6%)
<i>SLCO1B1</i>	rs4149056	4333 (34,8%)	647 (5,2%)	7483 (60,0%)

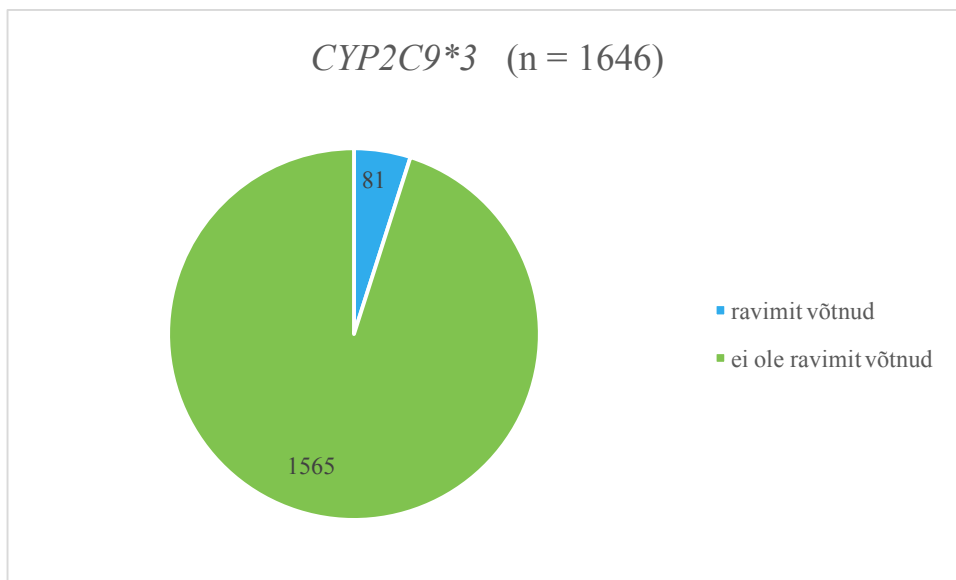


Joonis 5. Simvastatiini ja varfariini mõjutavate homosügootsete, heterosügootsete ning metsiktüüpi geenivariantide protsentuaalne esinemine TÕ EGV doonorite hulgas.

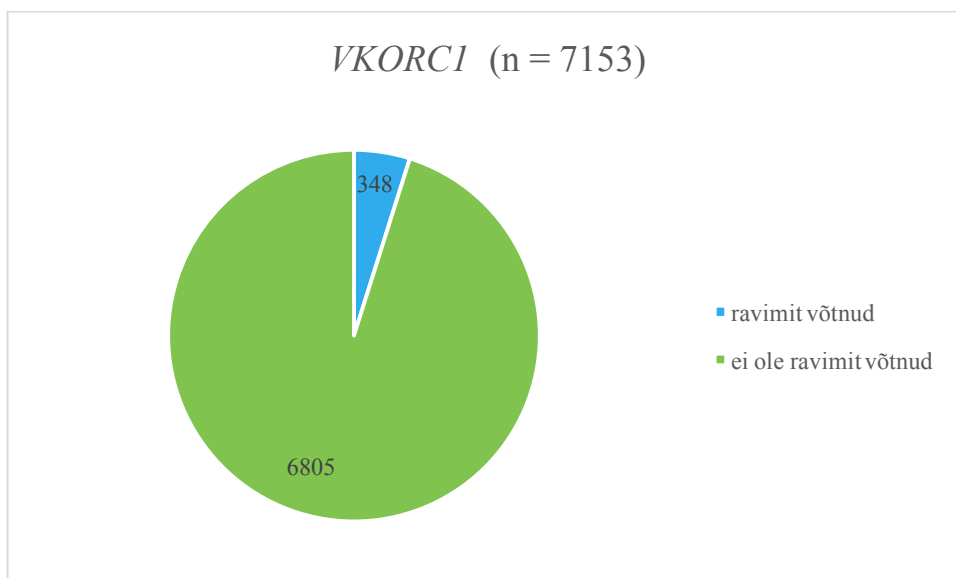
Analüüsidest TÕ EGV geenidoonorite genotüübiandmeid koos ravimiandmetega järeltub, et 4980-st isikust, kellel esineb simvastatiini ravimivastust mõjutav geenivariant *SLCO1B1* geenis hetero- või homosügootses olekus, on 279 (5,6%) tarvitanud hetkeseisuga ka simvastatiini (Joonis 9). *CYP2C9*2* aeglase metaboliseerija alleel esineb 2113 inimesel, *CYP2C9*3* 1646 inimesel ja geen *VKORC1* variatsioon 7153 inimesel, kellest vastavalt 101 (4,8%), 81 (4,9%) ning 348 (4,9%) on võtnud ka ravimit (Joonised 6, 7, 8).



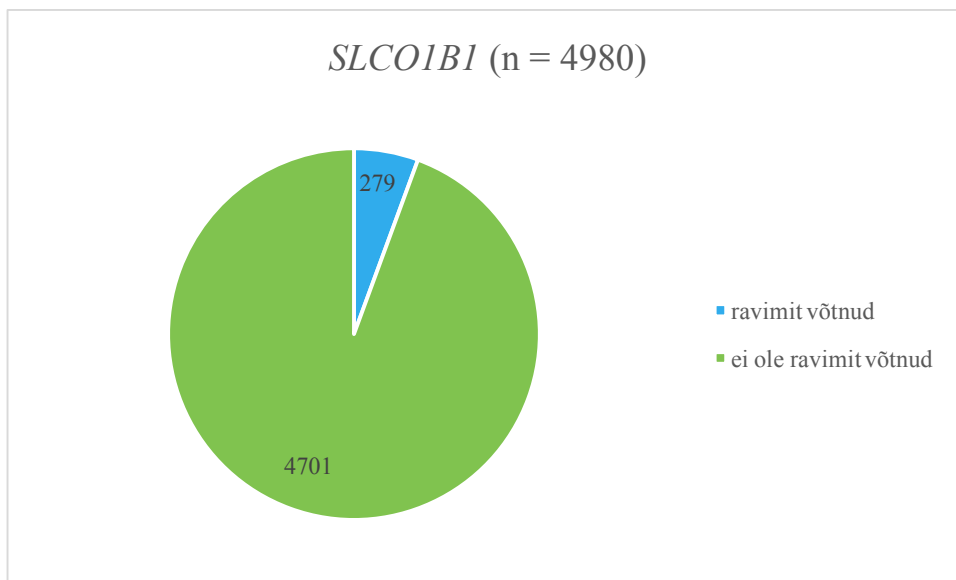
Joonis 6. TÕ EGV doonorite hulk, kellel on varfariini toimet mõjutav variant *CYP2C9*2* hetero- või homosügootses olekus ning, kui paljud neist on seda ravimit võtnud.



Jonis 7. TÜ EGV doonorite hulk, kellel on varfariini toimet mõjutav variant *CYP2C9*3* hetero- või homosügootses olekus ning, kui paljud neist on seda ravimit võtnud.



Joonis 8. TÜ EGV doonorite hulk, kellel on varfariini toimet mõjutav variant *VKORC1* hetero- või homosügootses olekus ning, kui paljud neist on seda ravimit võtnud.



Joonis 9. TÜ EGV doonorite arv, kellel on simvastatiini toimet mõjutav variant *SLCO1B1* hetero- või homosügootses olekus ning, kui paljud neist on seda ravimit võtnud.

Võttes näiteks ühe TÜ EGV doonori selgub, et ta on varfariini mõjutava *CYP2C9*3* suhtes heterosügoot ning *VKORC1* rs9923231 suhtes homosügoot, mille tõttu peaks varfariini algusdoos olema madalam, 0,5–2 mg/päevas vahel. Simvastatiini mõjutava variandi suhtes on geenidoonor homosügoot ehk kõrvalmõjude vältimiseks oleks soovitatav talle kirjutada madalam ravimiannus või alternatiivne statiin (Tabel 3).

Tabel 3. Varfariini ja simvastatiini suunistepõhine ravi ühele TÜ EGV doonorile.

Patsiendi sugu	Sünniaasta	Varfariini soovitatav ravi	Simvastatiini soovitatav ravi
Mees	1939	0,5–2 mg/päevas	Alandatud annus või alternatiivne statiin

2.4 Arutelu

Tänapäeval on selge, et ravimid mõjuvad inimestele erinevalt ning selle üks põhjustest on geneetiline varieeruvus (Weinshilbourn, 2003). Varasemalt on leitud mitmeid põhjuseid, miks geenandmete kasutamist ravi suunamisel mitte kasutusse võtta, kuid tehnoloogia kiire areng ning mitmete organisatsioonide (PharmGKB, CPIC jne) töö geen-ravim seoste tõestamisel ning selgitamisel on muutnud võimaliku kasutuselevõtu palju lihtsamaks (Dunnenberger et al., 2015) Käesoleva töö raames uuriti TÜ EGV doonorite hulgas CPIC suunistes kirjeldatud ravimite kasutamise sagedust ning järeldus, et 17910 geenidoonorile on välja kirjutatud 25 erinevat CPIC suunisega kõrge riskiga ravimit ning kõige enam oli välja kirjutatud simvastatiini ja varfariini.

Eestil on ennetava farmakogeneetilise testimise rakendamiseks mitmeid eeliseid võrreldes suurte riikidega nagu USA. Esiteks on Eestis üleriigiliselt ühtne tervishoiusüsteem ning juba välja arendatud elektrooniline süsteem terviseandmete säilitamiseks (<https://www.digilugu.ee/login>, seisuga 22.mai 2017). See tuleb kasuks ennetava farmakoloogilise testimise puhul, et patsiendi andmed oleksid koheselt kättesaadavad igal pool üle Eesti. Teiseks on TÜ EGV juba kogunud umbes 52 000 ehk 5% Eesti elanikkonna genoomi andmed. Neil 34%-l geenidoonoritel (n=17910), kellel töös tuvastati kõrge riskiga ravimi realiseerimine, võiksid geenandmed juba esineda terviselugudes ning arstid saaksid neid tulemusi ravi suunamisel rakendada. Sellest lähtuvalt hinnati antud töös ka edasi TÜ EGV doonorite hulgas enim tarvitavate ravimite varfariini ja simvastatiini ravivastust mõjutava kõrge riskiga genotüübi esinemist ehk kui paljudel oleks olnud ennetavast suunamisest potentsiaalselt kasu enne ravimi tarvitamist. Neil ja ka kõrge riskiga ravimit mitte tarvitanutel võiks info edaspidi tervisesüsteemis nähtav olla ning ravimi kirjutamisel võiksid esineda hoiatavad teatised- CDS (Dunnenberger et al., 2015), mis annaks arstidele märku väljakirjutatava ravimi geneetiliste riskide kohta ning soovitavad annuse muutmist või alternatiivset ravimit. Selles töös saadud andmed näitavat, et transporteri OATP1B1 funktsiooni aeglustav variatsioon geenis *SLCO1B1* (Ma ja Lu, 2011), mis mõjutab simvastatiini ravimivastust, esines 40% uuritavatest indiviididest. Nendest 5,2%-il oli variant homosügootses olekus (Tabel 3), mistõttu esineb suurem risk simvastatiini tarvitamisel kõrvaltoimete esinemiseks, kuna varasemast on teada, et selle variandi ühe alleeli esinemine juba suurendab müopaatia riski 5 korda (The SEARCH Collaborative Group, 2008). 94,4% uuritud geenidoonoritest, kellel esines variatsioon geenis *SLCO1B1*, ei ole hetkeseisuga simvastatiini veel tarvitanud, mistõttu oleks võimalik neil potentsiaalselt esinevad kõrvaltoimed ära hoida, kui geneetiline info ja suunised

oleks arstidele kättesaadavad (Joonis 9). Lisaks vaadates ravimiameti 2016.aasta statistikat selgub, et simvastatiin on populaarsuselt Eestis kolmas väljakirjutatav lipiidide sisaldust muutev ravim, mille päevaannus tuhande inimese kohta ööpäevas (DPD/1000/ööpäevas) on 6,1471. (www.ravimiamet.ee). Tegemist on seega sagedase ravimiga, mille suunatud ravi võiks olla potentsiaalselt nii patsientidele kui ka tervishoiusüsteemile kasulik.

Samuti oli TÜ EGV doonorite hulgas väga sagedane VKORC1 funktsiooni mõjutava variandi esinemine. SNP esines 57,4%-l, kellest 12,1% doonoritel oli tegemist homosügootse variandiga (Tabel 2). Kuigi *VKORC1* moodustab vaid 25% kõigist varfariini mõjutavatest faktoritest, peetakse teda kõige suuremaks varfariini efektiivse annuse mõjutajaks. rs9923231 põhjustab geeni ekspressiooni langust, mille tõttu ravim mõjub juba väiksemates kogustes (Owen et al., 2010). Kui samaaegselt peaks esinema ka *CYP2C9*2* või *CYP2C9*3*, mis olid olemas 16,9%-l ning 13,2%-l uuritud TÜ EGV doonoritest, siis tuleks annust veelgi alandada (Tabel 2) (Lisa 1). *VKORC1* rs9923231 alleelisagedus on Euroopas kõrge, mis viitab potentsiaalselt väga mitmete inimeste varfariini ravi suunamise vajalikkusele. Varfariini ravimitoime on ka üks enim uuritud ravimimõjusid ning Klein et al. poolt läbiviidud uuring näitas, et kui varfariini doseerimisel arvestatakse lisaks kliinilistele ja demograafilistele faktoritele ka geneetilist mõju, siis 46% patsientide jaoks muutus ravimi doseerimine efektiivsemaks (The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, 2009). Kuna varfariin on ka ravimiameti statistika andmetel Eestis tihti väljakirjutatav tromboosivastane ravim (DPD/1000/ööpäevas on 7,0482) ja uuringu alusel esines 57,4%-l geenidoonoritest vähemalt üks ravimi toimet mõjutav geneetiline variatsioon, oleks varfariini väljakirjutamisel farmakogeneetilisi andmete kasutamine soovitatav.

Lisaks olid töös uuritud inimestest, kellel oli vähemalt üks varfariini mõjutav alleel, ravimit juba realiseerinud 4,9% (Joonised 6, 7, 8). Simvastatiini puhul oli neid inimesi 5,6% (Joonis 9). Seega on sadadele kõrge riskiga geneetilise taustaga inimestele praeguseks juba kirjutatud ravimit, millel on suur tõenäosus põhjustada neile kõrvalmõjusid. Seetõttu esineb võimalus, et paljud neist patsientidest ei saanud koheselt tõhusat ravi ning võisid isegi vajada haiglaravi. Neid tervishoiukulutusi võiks vältida ennetava farmakogeneetilise testimisega. Samuti võivad kõrvalmõjud olla põhjuseks, et ravimeid on realiseeritud vähem kui väljakirjutatud (Joonis 4).

Analüüsides ravisuunised annab simvastatiini kohta suunis üldise soovituselise annuse alandamiseks või muu statiini kasutamiseks. Varfariini puhul on aga genotüübile vastavad soovitatavad varfariini alustusdoosid täpselt määratletud. Näiteks järeldeb ühe TÜ EGV

doonori genotüpiseerimisest, et tal on *CYP2C9**1/*3 ning *VKORC1* rs9923231>AA genotüüp. Varfariini doseerimistabeli järgi (Lisa 1) saab määrata, et metsiktüüpi alleeli korral on patsiendi varfariini algusannus 5–7 mg/päevas. Antud patsiendile soovitatav varfariini annus oleks aga väiksem - 0,5–2 mg/päevas. Lisaks on antud doonoril *SLCOB1B* rs4149056>CC genotüüp, mis tähendab, et tal on kaks vähenenud funktsiooniga alleeli. Ravimiandmete põhjal on näha, et sellele indiviidile on kirjutatud välja simvastatiini kuigi sellise genotüübiga patsiendil on suur risk simvastatiini kõrvalmõjude tekkeks. Farmakogeneetiliste andmete olemasolul võiks määrata sellele patsiendile väiksema simvastatiini annuse või kaaluda muu statiini kasutamist (Lisa 2) (Tabel 3).

Neid soovitusi on arstil raske koheselt ilma geneetilisi andmeid teadmata aimata. Geneetiliste andmete kasutamisest saadav kasu oleks maksimaalne, kui need andmed oleksid arstile kohe kättesaadavad, mis tähendaks, et patsientidel peaks juba ennetavalt olema genotüpiseeritud ravimitoimet mõjutavad geenid. Kuigi ennetavaks geneetiliseks testimiseks sobivaid ravimeid kirjutatakse kõige rohkem välja üle 40-aastastele patsientidele, võidakse siiski neid kirjutada ka noorematele. (Samwald et al., 2016) Kuna andmed püsivad muutumatuna elu jooksul võiks teadaolevad farmakogeneetilised markerid genotüpiseerida juba lastel. 2017.aastal alustatud PREPARE uuring on esimene, kes võttis eesmärgiks uurida ka ennetavast farmakogeneetilisest testimisest tulenevat majanduslikku kasu. Praegune ennustatav tulemus on, et pikas perspektiivis peaks tänu testimisele vähenenud ADR-ide esinemine ning ravi tõhususe suurenemine, vähendama ka tervishoiukulutusi. (Wouden et al., 2017)

KOKKUVÕTE

Bakalaureusetöö uuris, milliseid kõrge riskiga ravimeid, mis CPIC konsortsiumi hinnangul vajavad geneetilise info alusel koostatud ravisuuniseid, TÜ EGV doonorite hulgas tarbitakse ning, kui paljudel esineb ka selline geneetiline profiil, mis mõjutavad kahe enim välja kirjutatava ravimi, varfariini ning simvastatiini, toimet.

TÜ EGV doonoritest 17910 inimesele oli ajavahemikus 2.jaanuar 2004 – 15.juuli 2014 välja kirjutatud vähemalt üks 25-st CPIC suunisega ravim. Kaks enim väljakirjutatavat ravimit olid simvastatiin ja varfariin.

Varasemalt on näidatud, et varfariini toime on mõjutatud geenis *CYP2C9* esinevatest variatsioonidest rs1799853 ja rs1057910 ning geeni *VKORC1* varieeruvusest rs9923231. Simvastatiini ravimitoimet mõjutab geen *SCLO1B* esinev funktsiooni alandav variatsioon rs4149056. 12463 geenidoonoril olid eespool nimetatud variandid genotüpiseeritud ning töös järeldus, et varfariiniga seotud *CYP2C9**2, *CYP2C9**3 ning geeni *VKORC1* uuritud variant esinesid vastavalt 2113, 1646 ja 7153 indiviidil ning simvastatiiniga seotud *SLCO1B1* geneetiline variatsioon esines 4980 indiviidil. Analüüsides lisaks geenidoonorite ravimiandmeid järeldus, et 4,9% inimestest, kellel esines *VKORC1* või *CYP2C9* funktsiooni mõjutav geneetiline varieeruvus olid ka tarvitanud varfariini. Simvastatiini tarvitavate inimeste hulgas esines funktsiooni alandav *SLCO1B1* geneetiline variatsioon, mis suurendab simvastatiinist tingitud kõrvalmõjude tekkimise riski, 5,6% inimestel. 95,1% ja 94,6% vastavalt varfariini ja simvastatiini suhtes kõrge riskiga genotüübiga inimestele ei ole ravimit veel välja kirjutatud. Kui geneetiline informatsioon oleks ravimimääramisel arstidele kättesaadav, oleks võimalik neile inimestele kirjutada suunatud soovitusetega ravi, mis potentsiaalselt võiks vähendada asjatuid kulutusi ja ebameeldivusi nii patsiendile kui tervishoiusüsteemile.

The benefits and potential of using pre-emptive pharmacogenetical testing in Estonian medical system

Pauliina Ranne

SUMMARY

Drugs that are approved in clinical trials are being prescribed to patients following the principle of one-size-fits-all. In reality one drug and one dose might have very different effect on people. Drugs are effective on most people, but can have no effect or cause severe adverse reactions on others. Although, difference in drug response is being affected by physiological factors, environment and lifestyle, genetic factors are also responsible for the variability.

Pharmacogenetics studies how genetic variations cause differences in drug response and how to make drug therapy more effective and avoid adverse drug reactions. Due to the dropping cost of genome sequencing the field has developed very fast and many gene/drug associations have been discovered, but the uptake of this knowledge in practice has been slow. CPIC, founded in 2011, is writing dosing recommendations about gene/drug pairs that have strong evidence. By this time they have published 44 recommendations about 36 drugs that are associated with 14 genes. There are several programs in the US that are working on how to implement pre-emptive pharmacogenetic testing about gene/drug pairs mentioned in CPIC recommendations and using this data on drug prescribing and dosing. These programs have already shown that using genetic data can reduce adverse reactions manyfold.

This study is based on the data of Estonian Genome Centre, University of Tartu. 25 drugs with CPIC recommendations had been prescribed to 17910 gene donors between January 2, 2004 – July 15, 2014. Most commonly prescribed drugs were simvastatin, followed by warfarin, clopidogrel, allopurinol and many different antidepressants. Further analysis was made about donors who had been prescribed simvastatin or warfarin.

Simvastatin has strong evidence about association with rs4149056 in *SCLOBI*B. Warfarin has strong evidence about association with two variants in *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910) and rs9923231 in *VKORC1*. Genetic data about these variants was known about 12463 individuals. 2113 people of them were hetero- or homozygous about rs1799853, 1646 people about rs1057910, 7153 people about rs9923231 and 4980 people about rs4149056. Of them

respectively, 101 (4,8%), 81 (4,9%), 348 (4,9%) and 279 (5,6%) people had also taken the drug. Although, we do not have data about the adverse reactions occurred among these people we can say that based on this data there might be hundreds of adverse reactions that could be avoided by dosing and prescribing drugs based on genetic information.

There are several reasons why Estonia could start implementing pre-emptive pharmacogenetic testing in the example of the US programs. Firstly, it is a small country with unified and developed electronic health care system which means that storing data and communicating between different hospitals is much easier than in the US for example. Secondly, already about 5 % of Estonian population has it's genetic data collected and ready for use. By the ongoing programs it has been assumed that reducing adverse drug reactions by using genetic data can also save up money of health care system.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada juhendajaid Kristi Krebsi ja Lili Milanit toetuse ning nõuannete eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ahmed, S., Zhou, Z., Zhou, J., & Chen, S. Q. (2016). Pharmacogenomics of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters: Relevance to Precision Medicine. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 14(5), 298–313.
- Azarpira, N., Namazi, S., Hendijani, F., Banan, M., & Darai, M. (2010). Investigation of allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and VKORC1 in Iran. *Pharmacological Reports*, 62(4), 740–746.
- Davidson, M. H., Stein, E. A., Dujovne, C. A., ... Tobert, J. A. (1997). The Efficacy and Six-Week Tolerability of Simvastatin 80 and 160 mg/Day. *American Journal of Cardiology*, 79(1), 38–42.
- Dunnenberger, H. M., Crews, K. R., Hoffman, J. M., ... Relling, M. V. (2015). Preemptive clinical pharmacogenetics implementation: current programs in five United States medical centers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 55, 89–106.
- Flockhart, D. A., Orkane, D., Williams, M. S., ... Watson, M. S. (2008). Pharmacogenetic testing of CYP2C9 and VKORC1 alleles for warfarin. *Genet Med*, 10(2), 139–150.
- Gasche, Y., Daali, Y., Fathi, M., Chiappe, A., Cottini, S., Dayer, P., Desmeules, J. (2004). Codeine Intoxication Associated with Ultrarapid CYP2D6 Metabolism. *New England Journal of Medicine*, 351(27), 2827–2831.
- Howard, R. L., Avery, A. J., Slavenburg, S., Royal, S., Pipe, G., Lucassen, P., Pirmohamed, M. (2007). Which drugs cause preventable admissions to hospital? A systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 63(2), 136–147.
- Kalman, L. V, Black, J. L., Clinic, M., Sw, S., Bell, G. C. (2017). *Recommendations for Test Result Reporting* (Vol. 99).
- Kimmel, S. E., French, B., Kasner, S. E., ... Ellenberg, J. H. (2013). A Pharmacogenetic versus a Clinical Algorithm for Warfarin Dosing. *New England Journal of Medicine*, 369(24), 2283–2293.
- Lee, J. W., Aminkeng, F., Bhavsar, A. P., Shaw, K., Carleton, B. C., Hayden, M. R., Ross, C. J. D. (2014). The emerging era of pharmacogenomics: Current successes, future potential, and challenges. *Clinical Genetics*, 86(1), 21–28.
- Lindh, J. D., Holm, L., Dahl, M.-L., Alfredsson, L., Rane, A. (2008). Incidence and predictors of severe bleeding during warfarin treatment. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 25(2), 151–159.
- Ma, Q., Lu, A. Y. H. (2011). Conversational speech transcription using Context-Dependent Deep Neural Networks. *Proceedings of the Annual Conference of the International Speech Communication Association, INTERSPEECH*, 63(2), 437–440.
- Maggo, S. D. S., Savage, R. L., Kennedy, M. A. (2016). Impact of New Genomic Technologies on Understanding Adverse Drug Reactions. *Clinical Pharmacokinetics*, 55(4), 419–436.

- Owen, R. P., Gong, L., Sagreiya, H., Klein, T. E., Altman, R. B. (2010). VKORC1 Pharmacogenomics Summary. *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(10), 642–644.
- Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, and Niemi M (2006) SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenetics and Genomics* 16:873–879.
- Pirmohamed, M. (2013). Personalized Pharmacogenomics: Predicting Efficacy and Adverse Drug Reactions. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, (May), 1–22.
- Pirmohamed, M., Burnside, G., Eriksson, N., ... Wadelius, M. (2013). A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *The New England Journal of Medicine*, 369(24), 2294–303.
- Roche, J. C. (2014). Genotype-Guided Dosing of Vitamin K Antagonists: [Letter]. *The New England Journal of Medicine*, 370(18), 1761.
- Sachse, C., Brockmöller, J., Bauer, S., & Roots, I. (1997). Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *American Journal of Human Genetics*, 60(2), 284–295.
- Samwald, M., Xu, H., Blagec, K., ... Boyce, R. D. (2016). Incidence of exposure of patients in the United States to multiple drugs for which pharmacogenomic guidelines are available. *PLoS ONE*, 11(10), 1–17.
- Schildcrout, J. S., Denny, J. C., Bowton, E., ... Roden, D. M. (2012). Optimizing drug outcomes through pharmacogenetics: A case for preemptive genotyping. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 92(2), 235–242.
- Shuldiner, A. R., Relling, M. V, Peterson, ... Group, for the P. R. N. T. P. P. (2013). The Pharmacogenomics Research Network Translational Pharmacogenetics Program: Overcoming Challenges of Real-World Implementation. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 94(2), 207–210.
- Spear, B. B., Heath-Chiozzi, M., Huff, J. (2017). Clinical application of pharmacogenetics. *Trends in Molecular Medicine*, 7(5), 201–204.
- Sultana, J., Cutroneo, P., Trifirò, G. (2013). Clinical and economic burden of adverse drug reactions. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 4(Suppl1), S73–S77.
- Zhou, S.-F. (2009). Polymorphism of Human Cytochrome P450 2D6 and Its Clinical Significance. *Clinical Pharmacokinetics*, 48(11), 689–723.
- The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. (2009). Estimation of the Warfarin Dose with Clinical and Phrmacogenetical Data. *The New England Journal of Medicine*, 360: 753-764.
- The SEARCH Collaborative Group. (2008). SLCO1B1 Variants and Statin-Induced Myopathy — A Genomewide Study. *New England Journal of Medicine*, 359(8), 789–799.
- Thorn, C. F., Klein, T. E., Altman, R. B. (2013). PharmGKB: The Pharmacogenomics Knowledge Base. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1015, 311–320.

Van Driest, S. L., Shi, Y., Bowton, E. A., ... Roden, D. M. (2014). Clinically actionable genotypes among 10,000 patients with preemptive pharmacogenomic testing. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 95(4), 423–431.

Wei, L., Locuson, C. W., & Tracy, T. S. (2007). Polymorphic Variants of CYP2C9: Mechanisms Involved in Reduced Catalytic Activity. *Molecular Pharmacology*, 72(5), 1280 LP-1288.

Weinshilboum, R. (2003). Inheritance and drug response. *The New England Journal of Medicine*, 348(6), 529–537.

Wouden, C. H. Van Der, Cecchin, E., Cheung, K. C., Cl, D. (2017). Implementing Pharmacogenomics in Europe: Design and Implementation Strategy of the Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium, 101(3).

Yang, W., Wu, G., Broeckel, U., ... Relling, M. V. (2016). Comparison of genome sequencing and clinical genotyping for pharmacogenes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 100(4), 380–388.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. <https://www.pharmgkb.org/>
2. <https://cpicpgx.org/>
3. <http://ravimiamet.ee/ravimistatistika>
4. <https://www.digilugu.ee/login>

LISAD

Lisa 1. Varfariini doseerimistabel.

<i>VKORC1</i> Genotype (-1639G>A, rs9923231)	<i>CYP2C9</i> *1/*1	<i>CYP2C9</i> *1/*2	<i>CYP2C9</i> *1/*3	<i>CYP2C9</i> *2/*2	<i>CYP2C9</i> *2/*3	<i>CYP2C9</i> *3/*3
GG	5-7	5-7	3-4	3-4	3-4	0.5-2
GA	5-7	3-4	3-4	3-4	0.5-2	0.5-2
AA	3-4	3-4	0.5-2	0.5-2	0.5-2	0.5-2

Lisa 2. Eesti keelde tõlgitud CPIC suunis simvastatiini doseerimise kohta.

Fenotüüp	Diplootüüpide näited ^a	SNP <u>rs4149056</u> genotüüp	Mõju simvastatiinile	Simvastatiini annustamis-soovitused ^{b,c}	Soovituse klassifikatsioon ^d
Normaalse funktsiooniga, homosügootne metsiktüüp (kaks normaalse funktsiooniga alleeli)	*1a/*1a, *1a/*1b, *1b/*1b	TT	Normaalne müopaatia risk	Määrake soovitud algannus ja reguleerige simvastatiini annuseid haigusepõhiste suuniste kohaselt.	Tugev
Keskmise funktsiooniga, heterosügootne (üks normaalse funktsiooniga alleel ja üks vähenenud funktsiooniga alleel)	*1a/*5, *1a/*15, *1a/*17, *1b/*5, *1b/*15, *1b/*17	TC	Keskmine müopaatia risk	Määrake väiksem annus või kaaluge muu statiini kasutamist (nt pravastatiin või rosuvastatiin); kaaluge CK korrapärast jälgimist.	Tugev
Vähenenud funktsiooniga, homosügootne variant või mutant (kaks vähenenud funktsiooniga alleeli)	*5/*5, *5/*15, *5/*17, *15/*15, *15/*17, *17/*17	CC	Suur müopaatia risk	Määrake väiksem annus või kaaluge muu statiini kasutamist (nt pravastatiin või rosuvastatiin); kaaluge CK korrapärast jälgimist.	Tugev

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks.

Mina, Pauliina Ranne (sünnikuupäev: 24.07.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Ennetava farmakogeneetilise testimise kasulikkus ning potentsiaal Eesti tervisoiusüsteemis, mille juhendajad on Kristi Krebs ja Lili Milani.

1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 05.06.2017